健康人服用复合营养素补充剂后尿液蛋白质组的变化

沈梓芸，杨民辉，王海彤，高友鹤*

（北京师范大学 生命科学学院 基因工程药物及生物技术北京市重点实验室 北京 100875）

摘要：服用复合营养素补充剂是一种常见的健康管理手段。还没有研究从尿液蛋白质组的角度探究复合营养素补充剂对健康人的整体影响。本研究对比分析了健康人服用复合营养素补充剂 2 周后、4 周后与服用前的尿液蛋白质组，发现服用复合营养素补充剂 2 周后尿液蛋白质组的变化较为显著，差异蛋白及其富集到的通路与营养素补充可能相关，例如，促红细胞生成素受体（Erythropoietin receptor）（服用复合营养素两周后，9 人中有 4 人发生从无到有的变化，9 人的平均变化倍数（FC）达到 450）。本研究的结果从尿液蛋白质组的角度提供关于复合营养素补充剂对健康的影响的新线索，有助于优化复合营养素补充剂的使用指南和建议，有助于开发对于不同人群营养素补充的个性化策略。

关键词：尿液；蛋白质组；复合营养素；多种维生素/矿物质。

Changes in urinary proteome in healthy individuals taking multi-vitamin/mineral supplements

Ziyun Shen, Minhui Yang, Haitong Wang, Youhe Gao*

(Gene Engineering Drug and Biotechnology Beijing Key Laboratory, College of Life Sciences，Beijing Normal University, Beijing 100875, China)

Abstract: Taking compound nutrient supplements is a common means of health management. No studies have investigated the overall effects of complex nutrient supplements on healthy individuals from the perspective of the urine proteome. In this study, we compared and analyzed the urine proteome of healthy individuals after taking compound nutrient supplements for 2 weeks, 4 weeks and before taking them, and found that the urine proteome changed more significantly after taking compound nutrient supplements for 2 weeks, and the differential proteins and their enriched pathways may be associated with nutrient supplementation, such as erythropoietin receptor (fold change of 449.5 after taking compound nutrient supplements for 2 weeks). The results of this study provide new clues about the health effects of complex nutrient supplements from the perspective of the urine proteome and help to optimize guidelines and recommendations for the use of complex nutrient supplements.

Keywords: Urine; Proteome; Compound nutrients; Multivitamins/minerals.

基金项目：北京师范大学（11100704）

* 通讯作者（Corresponding author）：高友鹤（1964.06-），男，教授，博士生导师，主要研究方向：尿液蛋白质组学与尿液生物标志物. Tel: 010-58804382；E-mail：gaoyouhe@bnu.edu.cn.

1 引言

微量元素和维生素，合称为微量营养素(micronutrients, MNs)，是人体新陈代谢所必需的。在当今社会，人们对于维持良好健康的关注日益增加，服用多种维生素/矿物质（multi-vitamin and mineral, MVM）补充剂成为一种常见的健康管理手段。复合营养素补充剂涵盖广泛的营养成分，能够为人体提供膳食缺乏的微量元素和维生素，满足人体多种营养需求。随着人们对健康意识的提高，越来越多的人开始使用这些补充剂，期望通过维持全面的营养状态来促进身体健康。然而，尽管许多人使用这些补充剂以改善健康状况，但有关其对人体的具体影响仍存在许多未知之处。

过去的研究已经对复合营养素补充剂的作用进行了一些探索。早年的研究多集中在动物实验，人群研究主要聚焦于单一维生素或矿物质的补充效果，关注的多是疾病人群或是特殊人群的补充治疗，如老年人、孕妇和运动员等，针对健康大众人群的复合营养素补充干预研究较少。一些研究表明，复合营养素补充剂可以提供人体所需的微量元素和维生素，有助于强化免疫系统、改善心血管健康、增加抗氧化能力等。多种研究表明，维生素和矿物质之间存在相互作用，它们共同参与了多种生理过程，包括免疫调节、能量代谢和细胞修复等。复合营养素对于健康人营养状况、抗氧化能力[1]、运动能力、主观压力和情绪[2]的影响也被广泛研究。这些研究提供了一些证据支持复合营养素补充剂的潜在益处，但往往需要很大的人群数量或很长的实验时间，我们期待尿液蛋白质组为营养学提供新的研究角度，灵敏地显示短期补充营养素对于身体的影响。

由于尿液不属于内环境，对比血浆，尿液不存在稳态的机制，能够积累机体生理状态的早期变化，更敏感地反映出机体变化情况，是下一代生物标志物的来源[3]。尿液中的蛋白质包含丰富的信息，可以反映出机体不同系统、不同器官产生的微小变化。本实验室之前报道过，尿液蛋白质组能够较为系统、全面地反映苏糖酸镁摄入对机体产生的影响，有潜力为临床营养学研究和实践提供线索[4]。至今，还没有研究涉及复合营养素对健康成年人尿液蛋白质组的影响。

本研究旨在探究健康人补充复合营养素后尿液蛋白质组的变化，并进一步解析这种变化对健康的潜在影响。这一研究将有助于揭示复合营养素补充剂对人体代谢、生理功能和潜在疾病风险的影响，为理解其健康效应、为未来制定个性化的营养干预策略提供新的线索，有望为促进健康人群的生活质量提供新的科学依据，并为慢性病的预防和管理提供有益的启示。

2 材料与方法

2.1 实验材料

2.1.1 实验耗材

1.5ml/2ml 离心管（美国 Axygen 公司）、50ml/15ml 离心管（美国 Corning 公司）、96 孔细胞培养板（美国 Corning 公司）、10kD 滤器（美国 Pall 公司）、Oasis HLB 固相萃取柱（美国 Waters 公司）、1ml/200ul/20ul 移液枪头（美国 Axygen 公司）、BCA 试剂盒（美国 Thermo Fisher Scientific 公司）、高 pH 反向肽分离试剂盒(美国 Thermo Fisher Scientific 公司)、iRT (indexed retention time, 英国 BioGnosis 公司)。

2.1.2 实验仪器

冷冻高速离心机（美国 Thermo Fisher Scientific 公司）、真空浓缩仪（美国 Thermo Fisher Scientific 公司）、DK-S22 电热恒温水浴锅（上海精宏实验设备有限公司）、全波长多功能酶标仪（德国 BMG Labtech 公司）、振荡器（美国 Thermo Fisher Scientific 公司）、TS100 恒温混匀仪（杭州瑞诚仪器有限公司）、电子天平（瑞士 METTLER TOLEDO 公司）、-80℃ 超低温冷冻冰箱（美国 Thermo Fisher Scientific 公司）、EASY-nLC1200 超高效液相色谱（美国 Thermo Fisher Scientific 公司）、Orbitrap Fusion Lumos Tribird 质谱仪（美国 Thermo Fisher Scientific 公司）。

2.1.3 实验试剂

使用的营养素补充剂为21金维他多维元素片(杭州民生健康药业股份有限公司)。此外，还使用了胰酶Trypsin Golden（美国Promega公司)、二硫苏糖醇DTT（德国Sigma公司)、碘乙酰胺IAA（德国Sigma公司)、碳酸氢铵NH4HCO3（德国Sigma公司)、尿素Urea（德国Sigma公司)、纯净水（中国娃哈哈公司)、质谱级甲醇（美国Thermo Fisher Scientific公司)、质谱级乙腈(美国Thermo Fisher Scientific公司)、质谱级纯水(美国Thermo Fisher Scientific公司)、Tris-Base（美国Promega公司)、硫脲Throurea（德国Sigma公司）等试剂。

2.1.4 分析软件

Proteome Discoverer(Version2.1,美国Thermo Fisher Scientific公司)、Spectronaut Pulsar(英国Biognosys公司)、Ingenuity Pathway Analysis(德国Qiagen公司)；R studio（Version1.2.5001)；Xftp 7；Xshell 7。

2.2 实验方法

2.2.1 研究对象选取与设计

选取22-27岁健康成年志愿者共11名作为实验对象，包括5名男性、6名女性，选取标准定为体检健康，排除心、肺、肝、脾疾患。保持干预前后膳食、生活方式习惯基本不变，实验前一周至实验开始时均无食用营养保健品或膳食补充剂。健康志愿者每天服用2片复合营养素片，共服用4周。

研究使用的复合营养素补剂是21金维他多维元素片。每名健康志愿者每天服用2片复合营养素片，共服用4周。每片复方营养素片含有L-赖氨酸盐12.5mg，维生素A 2500IU，维生素D2 200IU，维生素E 5mg，维生素B1 2.5mg，维生素B2 2.5mg，维生素B6 0.25mg，维生素B12 0.5ug，维生素C 25mg，烟酰胺7.5mg，泛酸钙2.5mg，重酒石酸胆碱 25mg，肌醇 25mg，铁5mg，碘 0.05mg，铜0.5mg，锰0.5mg，锌0.25mg，磷酸氢钙279mg，镁0.5mg，钾5mg。

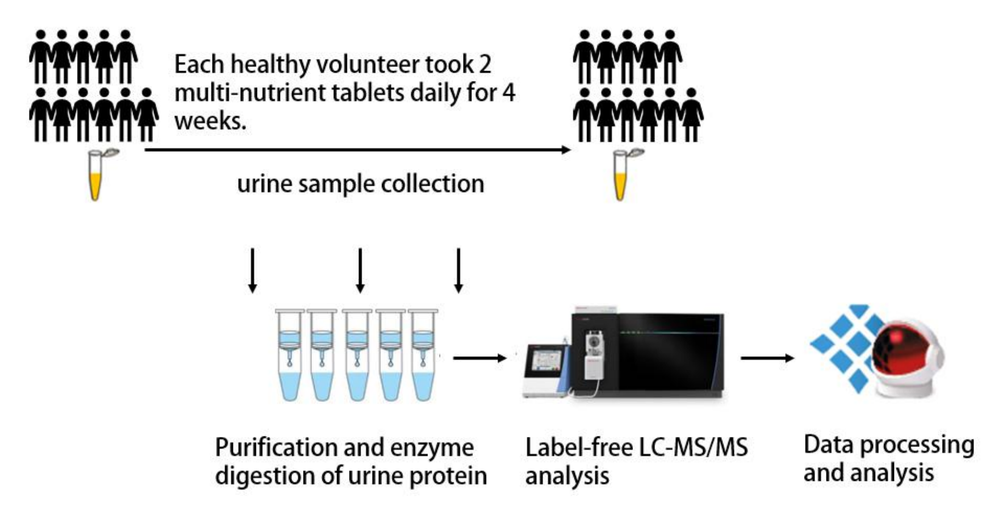


图1 研究方法与技术路线

2.2.2 尿液样本收集

本研究收集了11名健康志愿者的的尿液样本，分别在服用复合营养素补剂前(记为W0，编号为301-311)、服用2周后（记为W2，编号为401-411)、服用4周后（记为W4，编号为501-511)收取尿液样本。尿液样本是中段晨尿，避开女性月经期。尿液样本收集后置于-80℃冰箱暂存备用。

2.2.3 尿液样本处理

取出2ml尿样解冻，4℃，12000×g 条件下离心30分钟，去除细胞碎片，取上清液加入1M二硫苏糖醇（Dithiothreitol, DTT, Sigma）贮液40ul，达到DTT的工作浓度20mM，混匀后金属浴 37℃加热60分钟,晾凉至室温后,加入碘乙酰胺(Iodoacetamide, IAA, Sigma)贮液100ul，达到IAM的工作浓度，混匀后常温避光反应45分钟。反应结束后，将样本转移至新的离心管中，与三倍体积的预冷无水乙醇充分混合，置于-20℃冰箱中24小时沉淀蛋白。沉淀结束，4℃，10000×g 条件下离心 30 分钟，弃去上清，干燥蛋白沉淀，向蛋白沉淀中加入200ul 20mM Tris溶液复溶。复溶后的样品离心后保留上清液，采用 Bradford 法测定蛋白质浓度。使用滤器辅助样品制备（FASP）的方法，将尿蛋白提取液加入 10kD 超滤管（Pall, Port Washington, NY, USA）的滤膜上，分别加入20mM Tris溶液洗涤三次，加入30mM Tris溶液重溶蛋白，每个样品按比例（尿蛋白：胰酶=50：1）加入胰蛋白酶（Trypsin Gold, Mass Spec Grade, Promega, Fitchburg, WI, USA）进行消化，37℃孵育16小时，酶解后的滤液即为多肽混合液。收集到的多肽混合液通过Oasis HLB固相萃取柱进行除盐处理后真空干燥，置于-80℃保存。加入30微升0.1%甲酸水将冻干多肽粉末复溶后，使用 BCA试剂盒对肽段浓度进行测定，将肽段浓度稀释至0.5μg/μL，每个样本取出4微升作为mix样本。

2.2.4 LC-MS/MS 串联质谱分析

所有鉴定样品以样品：iRT为20：1 的体积比例加入稀释100倍的iRT标准液，统一保留时间。对所有样本进行数据非依赖性采集（DIA），每个样本重复3次，每隔10针插入1针mix样本作为质量控制。将1ug样本使用EASY-nLC1200液相色谱分离（洗脱时间：90min，梯度：流动相A：0.1%甲酸、流动相B：80%乙腈），洗脱下来的肽段进入Orbitrap Fusion Lumos Tribird质谱仪分析，生成样品对应的raw文件。

2.2.5 数据处理和分析

将DIA模式下采集的raw文件导入Spectronaut软件分析，高度可信蛋白标准为肽段q value<0.01，应用峰面积定量法对二级肽段所有碎片离子峰面积进行蛋白定量，自动归一化处理。

保留含有两个或以上特异肽段的蛋白，将缺失值替换成0，计算各个样本鉴定到的不同蛋白含量，将样本进行比较，筛选差异蛋白。

利用悟空平台(https://omicsolution.org/wkomics/main/)进行非监督聚类分析(HCA)、主成分分析（PCA）、OPLS-DA分析。使用DAVID数据库（https://david.ncifcrf.gov/）进行差异蛋白功能富集分析，得到生物学过程、细胞定位和分子功能3个方面的结果。基于Pubmed数据库（https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/）对差异蛋白和相关通路进行搜索。使用STRING数据库进行蛋白互作网络分析（https://cn.string-db.org/）。

3 结果与讨论

3.1 样本蛋白质鉴定结果

我们对收集的尿液样本进行尿液蛋白质的提取、酶切和液相色谱串联质谱分析后，（将混合样本计入）每个样本平均鉴定到3077个蛋白（蛋白和肽段FDR＜1%），标准差为628。服用复合营养素补剂前（记为W0，编号为301-311，共11个样本）鉴定蛋白平均数为3026,标准差为663；服用2周后（记为W2，编号为401-404，406-410，共9个样本）鉴定蛋白平均数为2890,标准差为434；服用4周后（记为W4，编号为501-511，共11个样本）鉴定蛋白平均数为3058,标准差为657；mix样本鉴定蛋白平均数为3745，标准差为337，说明数据重复性较好。

3.2 摄入营养素补充剂两周后尿液蛋白质组的变化

3.2.1 差异蛋白分析

将缺失值替换成 0，将摄入营养素补充剂前（W0）与摄入营养素补充剂 2 周后（W2）的样本进行比较，进行双尾、配对 t 检验，筛选出 228 个差异蛋白。筛选差异蛋白条件是：T 检验分析 P 值<0.05， Fold change (FC)>1.5 或<0.67。

其中，有 14 个差异蛋白变化倍数大于 10，24 个差异蛋白变化倍数大于 5。由于篇幅有限，仅将 FC>5 或<0.2 的差异蛋白展示在表格中。

促红细胞生成素受体（Erythropoietin receptor）的 FC 为 449.5。促红细胞生成素可促进造血祖细胞增殖、分化，促红细胞生成素及其受体在人体内发挥神经营养和神经保护作用[5]。有研究显示铁和复合微量营养素显著提高小鼠的血红蛋白、红细胞压积和血清铁水平。可能补充复合营养素与红细胞[6]。

有 4 个差异蛋白呈现从有到无的变化，FC 为 0，包括 26S 蛋白酶体非 ATP 酶调节亚基 8、二磷酸甲羟戊酸脱羧酶、原钙粘蛋白γ-A2、2-氨基-3-羧基粘康酸-6-半醛脱羧酶。

表 1 摄入营养素补充剂前（W0）与摄入营养素补充剂 2 周后（W2）变化显著的差异蛋白（FC>5 或<0.2，P 值<0.05）

Protein Accessions	Genes	Protein Descriptions	fc	P
P48556	PSMD8	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 8	0	0.038649
P53602	MVD	Diphosphomevalonate decarboxylase	0	0.048419
Q5DRB8	PCDHGA2	Protocadherin gamma-A2;Protocadherin gamma-A2	0	0.031711
Q8TDX5	ACMSD	2-amino-3-carboxymuconate-6-semialdehyde decarboxylase	0	0.027933
P22695	UQCRC2	Cytochrome b-c1 complex subunit 2, mitochondrial	0.009509	0.049178
O00232	PSMD12	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 12	0.030438	0.02393
Q13098	GPS1	COP9 signalosome complex subunit 1	0.033099	0.045756
P09110	ACAA1	3-ketoacyl-CoA thiolase, peroxisomal	0.047178	0.033051
Q9Y5F2	PCDHB11	Protocadherin beta-11	0.050547	0.01348
P18850	ATF6	Cyclic AMP-dependent transcription factor ATF-6 alpha	0.054547	0.006267
P21217	FUT3;FUT5	3-galactosyl-N-acetylglucosaminide 4-alpha-L-fucosyltransferase FUT3	0.054779	0.034761
Q9Y5X3	SNX5	Sorting nexin-5	0.072226	0.043244
Q9UJA9	ENPP5	Ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase family member 5	0.095243	0.032667
O75019	LILRA1	Leukocyte immunoglobulin-like receptor subfamily A member 1	0.111365	0.030126
Q9BQA1	WDR77	Methylosome protein 50;Isoform 2 of Methylosome protein 50	0.113783	0.046788
Q14353	GAMT	Guanidinoacetate N-methyltransferase	0.132321	0.006693
O43242	PSMD3	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 3	0.13622	0.008648
Q14264	ERV3-1	Endogenous retrovirus group 3 member 1 Env polyprotein	0.178283	0.033023
Q9Y303	AMDHD2	N-acetylglucosamine-6-phosphate deacetylase	0.185786	0.03972
O94813	SLIT2	Slit homolog 2 protein	0.189666	0.044398
Q9Y265	RUVBL1	RuvB-like 1;Isoform 2 of RuvB-like 1	0.189757	0.031234
Q13428	TCOF1	Treacle protein;Isoform 2 of Treacle protein	7.310235	0.046664
P19235	EPOR	Erythropoietin receptor	449.5454	0.04668

3.2.2 差异蛋白功能注释分析

利用 DAVID 数据库对 228 个差异蛋白（P 值<0.05，FC>1.5 或<0.67）进行 Gene Oncology(GO)分析，富集到 74 个生物学过程（BP）（P 值<0.05），包括细胞形状的调节、通过多泡体分选途径的泛素依赖性蛋白分解代谢过程、蛋白质转运、Rac 蛋白信号转导、通过宿主 ESCRT 复合物的病毒出芽、多泡体装配、腺苷酸环化酶调节 G 蛋白偶联受体信号通路、细胞迁移的正调控、信号传导、细胞增殖的正调控等。由于篇幅有限，按照 p 值大小取排名前四十的 BP 进行展示。

表 2 摄入营养素补充剂前（W0）与摄入营养素补充剂 2 周后（W2）组间差异蛋白富集到的生物学过程（BP）(按照 p 值大小取排名前四十的 BP 进行展示)

Term	Count	%	P-Value
regulation of cell shape	12	5.6	5.50E-07
ubiquitin-dependent protein catabolic process via the multivesicular body sorting pathway	7	3.2	7.10E-07
protein transport	19	8.8	1.00E-06
Rac protein signal transduction	6	2.8	7.90E-06
viral budding via host ESCRT complex	5	2.3	7.30E-05
multivesicular body assembly	5	2.3	2.90E-04
adenylate cyclase-modulating G-protein coupled receptor signaling pathway	6	2.8	3.70E-04
regulation of actin cytoskeleton organization	7	3.2	6.30E-04
membrane fission	5	2.3	7.80E-04
cell-matrix adhesion	7	3.2	1.00E-03
regulation of organelle assembly	3	1.4	1.10E-03
endocytosis	9	4.2	1.20E-03
establishment of endothelial barrier	4	1.9	1.30E-03
negative regulation of adenylate cyclase activity	4	1.9	1.30E-03
regulation of cell size	4	1.9	1.90E-03
positive regulation of cell migration	10	4.6	2.00E-03
Rho protein signal transduction	5	2.3	3.30E-03
positive regulation of early endosome to late endosome transport	3	1.4	3.70E-03
viral budding	3	1.4	3.70E-03
cell-cell adhesion	8	3.7	4.50E-03
positive regulation of protein localization to early endosome	3	1.4	4.60E-03
signal transduction	25	11.6	5.00E-03
actin filament organization	7	3.2	5.80E-03
macroautophagy	5	2.3	6.50E-03
cell surface pattern recognition receptor signaling pathway	3	1.4	6.70E-03
actin filament bundle assembly	4	1.9	6.70E-03
positive regulation of renal sodium excretion	3	1.4	7.80E-03
endosomal transport	5	2.3	9.00E-03
actin crosslink formation	3	1.4	9.10E-03
positive regulation of cellular protein catabolic process	3	1.4	9.10E-03
positive regulation of urine volume	3	1.4	9.10E-03
negative regulation of cell growth	6	2.8	1.00E-02
protein targeting to vacuole involved in ubiquitin-dependent protein catabolic process via the multivesicular body sorting pathway	3	1.4	1.00E-02

G-protein coupled acetylcholine receptor signaling pathway	3	1.4	1.00E-02
positive regulation of ruffle assembly	3	1.4	1.00E-02
regulation of blood pressure	5	2.3	1.10E-02
positive regulation of substrate adhesion-dependent cell spreading	4	1.9	1.20E-02
intracellular transport	4	1.9	1.60E-02
positive regulation of actin filament polymerization	4	1.9	1.60E-02
viral release from host cell	3	1.4	1.60E-02

利用 DAVID 数据库对个差异蛋白（P 值<0.05，FC>1.5 或<0.67）进行 Gene Oncology(GO)分析，富集到 24 个分子功能（MF），包括蛋白结合、钙粘蛋白结合、GTP 结合、GTP 酶活性、G-蛋白β/γ亚基复合物结合、鸟苷酸结合、细胞骨架蛋白结合、G 蛋白偶联受体结合、GDP 结合、ATP 酶结合、钙依赖性蛋白结合、肌动蛋白结合、泛素结合、蛋白激酶激活剂活性、蛋白多糖结合、cAMP 反应元件结合、钙离子结合、跨膜信号受体活性、蛋白激酶 A 结合、ATP 酶激活剂活性、胶原结合、细胞粘附分子结合、利钠肽受体活性、肝素结合等。

表 3 摄入营养素补充剂前（W0）与摄入营养素补充剂 2 周后（W2）组间差异蛋白富集到的分子功能（MF）（P 值<0.05）

Term	Count	%	P-Value
protein binding	170	76.9	3.30E-07
cadherin binding	17	7.7	4.30E-07
GTP binding	18	8.1	2.10E-06
GTPase activity	15	6.8	4.30E-05
G-protein beta/gamma-subunit complex binding	5	2.3	8.30E-05
guanyl nucleotide binding	4	1.8	2.50E-04
cytoskeletal protein binding	6	2.7	5.50E-04
G-protein coupled receptor binding	6	2.7	1.10E-03
GDP binding	6	2.7	1.50E-03
ATPase binding	6	2.7	2.40E-03
calcium-dependent protein binding	6	2.7	3.40E-03
actin binding	11	5	4.20E-03
ubiquitin binding	6	2.7	4.40E-03
protein kinase activator activity	4	1.8	9.20E-03
proteoglycan binding	3	1.4	9.70E-03
cAMP response element binding	3	1.4	1.40E-02
calcium ion binding	16	7.2	1.80E-02
transmembrane signaling receptor activity	7	3.2	2.20E-02
protein kinase A binding	3	1.4	3.20E-02
ATPase activator activity	3	1.4	3.70E-02
collagen binding	4	1.8	3.70E-02
cell adhesion molecule binding	4	1.8	4.00E-02
natriuretic peptide receptor activity	2	0.9	4.30E-02
heparin binding	6	2.7	4.50E-02

差异蛋白富集到 49 个 KEGG 通路（P 值<0.05），包括内吞作用、长期抑郁、胆碱能突触、

肌动蛋白细胞骨架的调节、生长激素的合成、分泌和作用、鞘脂信号通路、人巨细胞病毒感染、多巴胺能突触、酒精中毒、松弛素信号通路、cGMP-PKG 信号通路、黑色素生成、雌激素信号通路、Apelin 信号通路、甲状旁腺激素的合成、分泌和作用、突触引导、帕金森病、PI3K-Akt 信号通路、朊病毒病、趋化因子信号通路、血清素能突触、致病性大肠杆菌感染、缝隙连接、人类免疫缺陷病毒 1 感染、紧密连接、昼夜节律、肾素分泌、逆行内源性大麻素信号传导、吞噬体、心肌细胞肾上腺素能信号传导、催产素信号通路、库欣综合征、白细胞跨内皮迁移、血管加压素调节的水重吸收、MAPK 信号通路、Rap1 信号通路、血小板活化、可卡因成瘾、神经退行性病变的途径-多种疾病、化学致癌作用-活性氧、cAMP 信号通路、血管平滑肌收缩、肺结核、人乳头瘤病毒感染、粘附连接、GnRH 信号通路、产热、Ras 信号通路、醛固酮合成和分泌等。

长期抑郁、多巴胺能突触、突触引导、帕金森病、血清素能突触、逆行内源性大麻素信号传导等 KEGG 通路显示与认知和情绪的相关性。有研究显示，Omega-3 脂肪酸、抗氧化剂（维生素 C 和锌）、维生素 B 家族成员（维生素 B12 和叶酸）和镁等营养素可以防止与认知和情感行为相关的神经元回路中线粒体和脂质的氧化损伤的方式[7]。10 个差异蛋白富集到胆碱能突触这一 KEGG 通路。志愿者服用的复合营养素补剂中包含重酒石酸胆碱（50mg/d）。此外，一些 KEGG 通路和免疫系统有关。

表 4 摄入营养素补充剂前（W0）与摄入营养素补充剂 2 周后（W2）组间差异蛋白富集到的 KEGG 通路（P 值<0.05）

Term	Count	%	P-Value
Endocytosis	16	7.2	1.50E-06
Long-term depression	8	3.6	1.70E-05
Cholinergic synapse	10	4.5	2.40E-05
Regulation of actin cytoskeleton	13	5.9	7.00E-05
Growth hormone synthesis, secretion and action	9	4.1	2.40E-04
Sphingolipid signaling pathway	9	4.1	2.50E-04
Human cytomegalovirus infection	12	5.4	2.60E-04
Dopaminergic synapse	9	4.1	4.50E-04
Alcoholism	10	4.5	1.10E-03
Relaxin signaling pathway	8	3.6	2.00E-03
cGMP-PKG signaling pathway	9	4.1	2.10E-03
Melanogenesis	7	3.2	2.60E-03
Estrogen signaling pathway	8	3.6	2.80E-03
Apelin signaling pathway	8	3.6	3.00E-03
Parathyroid hormone synthesis, secretion and action	7	3.2	3.30E-03
Axon guidance	9	4.1	3.60E-03
Parkinson disease	11	5	3.60E-03
PI3K-Akt signaling pathway	13	5.9	3.80E-03
Prion disease	11	5	4.20E-03
Chemokine signaling pathway	9	4.1	4.90E-03
Serotonergic synapse	7	3.2	5.00E-03
Pathogenic Escherichia coli infection	9	4.1	5.90E-03
Gap junction	6	2.7	7.20E-03
Human immunodeficiency virus 1 infection	9	4.1	8.80E-03
Tight junction	8	3.6	8.90E-03

Circadian entrainment	6	2.7	1.10E-02
Renin secretion	5	2.3	1.50E-02
Retrograde endocannabinoid signaling	7	3.2	1.60E-02
Phagosome	7	3.2	1.80E-02
Adrenergic signaling in cardiomyocytes	7	3.2	1.90E-02
Oxytocin signaling pathway	7	3.2	1.90E-02
Cushing syndrome	7	3.2	2.00E-02
Leukocyte transendothelial migration	6	2.7	2.10E-02
Vasopressin-regulated water reabsorption	4	1.8	2.20E-02
MAPK signaling pathway	10	4.5	2.30E-02
Rap1 signaling pathway	8	3.6	2.60E-02
Platelet activation	6	2.7	2.80E-02
Cocaine addiction	4	1.8	3.00E-02
Pathways of neurodegeneration - multiple diseases	13	5.9	3.00E-02
Chemical carcinogenesis - reactive oxygen species	8	3.6	3.40E-02
cAMP signaling pathway	8	3.6	3.50E-02
Vascular smooth muscle contraction	6	2.7	3.70E-02
Tuberculosis	7	3.2	3.80E-02
Human papillomavirus infection	10	4.5	3.90E-02
Adherens junction	5	2.3	3.90E-02
GnRH signaling pathway	5	2.3	3.90E-02
Thermogenesis	8	3.6	4.10E-02
Ras signaling pathway	8	3.6	4.40E-02
Aldosterone synthesis and secretion	5	2.3	4.60E-02

3.3 摄入营养素补充剂四周后尿液蛋白质组的变化

3.3.1 差异蛋白分析

将缺失值替换成 0，将摄入营养素补充剂前（W0）与摄入营养素补充剂 4 周后（W4）的样本进行比较，筛选出 79 个差异蛋白。筛选差异蛋白条件是：T 检验分析 P 值<0.05， Fold change (FC)>1.5 或<0.67。

前后变化倍数在五倍以上的蛋白有 5 个，分别是含血小板反应蛋白基序 3 的去整合素和金属蛋白酶、胍基乙酸 N-甲基转移酶、α 链纤维蛋白原、空泡蛋白分类相关蛋白 26A、RNA 结合蛋白 14。

表 5 摄入营养素补充剂前（W0）与摄入营养素补充剂 4 周后（W4）变化显著的差异蛋白（FC>5 或<0.2，P 值<0.05）

Protein Accessions	Genes	Protein Descriptions	fc	P
O15072	ADAMTS3	A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 3	0.135105	0.047508
Q14353	GAMT	Guanidinoacetate N-methyltransferase	0.1736	0.029328
P02671	FGA	Fibrinogen alpha chain	5.226891	0.033691
O75436	VPS26A	Vacuolar protein sorting-associated protein 26A	11.03069	0.015457
Q96PK6	RBM14	RNA-binding protein 14	13.52475	0.032191

3.3.2 差异蛋白功能注释分析

利用 DAVID 数据库对个差异蛋白（P 值<0.05，FC>1.5 或<0.67）进行 Gene Oncology(GO)分析，富集 20 个生物学过程（BP）（P 值<0.05），包括蛋白质去糖基化、上皮细胞分化、蛋白质分泌、中间丝组织、表皮发育、细胞内蛋白质转运、外源性凋亡信号通路的负调控、内质网到高尔基体囊泡介导的转运、表皮发育的正调控、中心粒装配、内吞再循环、中心粒复制的负调控、细胞间粘附、内吞作用、甘露糖代谢过程、蛋白质加工、细胞内信号转导的正调控、逆行转运，内体到高尔基体、轴突再生负调控、角化。

表 6 摄入营养素补充剂前（W0）与摄入营养素补充剂 4 周后（W4）组间差异蛋白富集到的生物学过程（BP）

Term	Count	%	P-Value
protein deglycosylation	3	3.8	3.50E-04
epithelial cell differentiation	5	6.4	4.80E-04
protein secretion	4	5.1	1.60E-03
intermediate filament organization	4	5.1	1.90E-03
epidermis development	4	5.1	3.70E-03
intracellular protein transport	6	7.7	7.30E-03
negative regulation of extrinsic apoptotic signaling pathway	3	3.8	7.80E-03
ER to Golgi vesicle-mediated transport	4	5.1	1.30E-02
positive regulation of epidermis development	2	2.6	1.80E-02
centriole assembly	2	2.6	2.10E-02
endocytic recycling	3	3.8	2.20E-02
negative regulation of centriole replication	2	2.6	2.80E-02
cell-cell adhesion	4	5.1	3.30E-02
endocytosis	4	5.1	3.50E-02
mannose metabolic process	2	2.6	3.50E-02
protein processing	3	3.8	3.80E-02
positive regulation of intracellular signal transduction	2	2.6	3.90E-02
retrograde transport, endosome to Golgi	3	3.8	4.00E-02
negative regulation of axon regeneration	2	2.6	4.20E-02
keratinization	3	3.8	4.30E-02

表 7 摄入营养素补充剂前（W0）与摄入营养素补充剂 4 周后（W4）组间差异蛋白富集到的分子功能（MF）

Term	Count	%	P-Value
structural constituent of epidermis	4	5.1	3.30E-04
GDP binding	4	5.1	3.00E-03
cytokine binding	3	3.8	1.30E-02
GTP binding	6	7.7	1.80E-02
calcium ion binding	8	10.3	2.30E-02
protein binding	56	71.8	3.30E-02
alpha-mannosidase activity	2	2.6	3.30E-02
GTPase activity	5	6.4	4.70E-02

差异蛋白富集到 8 个分子功能（MF）（P 值<0.05），包括表皮的结构成分、GDP 结合、细胞因子结合、GTP 结合、钙离子结合、蛋白结合、α-甘露糖苷酶活性、GTP 酶活性。

差异蛋白富集到 2 个 KEGG 通路，6 个差异蛋白富集到内吞作用，3 个差异蛋白富集到氨基酸的生物合成。

4 展望

研究结果说明，连续服用复合营养素补剂一个月的健康人尿液蛋白质组产生了一些变化。例如，服用复合营养素两周后尿液蛋白质组中的促红细胞生成素受体（Erythropoietin receptor）的平均变化倍数为 449.5，9 人中有 4 人发生从无到有的变化（根据 spectronaut 的分析结果，分别是从 0 到 14635，11851，11181，5930）。

但是这种变化的个体差异性较大。究其原因，可能原因有以下几点：首先，可能是因为不同人饮食习惯不同、身体营养素储备的本底水平不同，需要补充的营养素的种类和剂量各不相同，不同人摄入复合营养素补剂后身体状况以及营养素对身体的影响也不同，因此异质性较大；第二，可能是复合营养素补剂的剂量较小，补充时间比较短，对机体影响较小。

根据我们的发现，不同个体对于营养素的种类和剂量需求不同，提供针对特定人群的个性化补充建议十分重要，个性化定制可以最大程度地发挥其潜在益处并减少潜在风险。尿液蛋白质组也有潜力为个性化的营养素补充提供线索。

此外，服用复合营养素补剂两周后（W2）尿液蛋白质组的变化比服用复合营养素补剂四周后（W4）的变化更加显著，可能是因为随着时间增加，志愿者的依从性下降，也可能提示营养素在短期对机体的影响比较大，随着时间增长，复合营养素对机体的影响不够明显。

本研究的结果从尿液蛋白质组的角度提供关于复合营养素补充剂对健康的影响的新线索，有助于优化复合营养素补充剂的使用指南和建议。本文中使用的个性化的分析方法，也为相关领域的研究提供了一些参考。我们期待后续研究可以测定体液样本中微量营养素、身体各项指标，进一步分析补充复合营养素后尿液蛋白质组的变化，可以更好地了解这些补充剂对人体代谢、生理功能和健康状态的调节作用，为开发新的营养干预策略和创新的功能性食品提供基础。

参考文献：

[1] Cheng T-Y, Zhu Z, Masuda S, et al. Effects of multinutrient supplementation on antioxidant defense systems in healthy human beings[J]. The Journal of Nutritional Biochemistry, 2001, 12(7): 388 - 395.

[2] White D J, Cox K H M, Peters R, et al. Effects of Four-Week Supplementation with a Multi-Vitamin/Mineral Preparation on Mood and Blood Biomarkers in Young Adults: A Randomised, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial[J]. Nutrients, 2015, 7(11): 9005 - 9017.

[3] Gao Y. Urine-an untapped goldmine for biomarker discovery?[J]. Science China. Life Sciences, 2013, 56(12): 1145 - 1146.

[4] Shen Z, Yang M, Wang H, et al. Changes in the urinary proteome of rats after short-term intake of magnesium L-threonate(MgT)[J]. Frontiers in Nutrition, 2023, 10: 1305738.

[5] Tilbrook P A, Klinken S P. The erythropoietin receptor[J]. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 1999, 31(10): 1001 - 1005.

[6] 张萍 韦娜 等. 铁和复合微量营养素改善缺铁性贫血的实验研究[J]. Wei liang yuan su yu jian kang yan jiu = Studies of trace elements and health, 总后防疫队军

队卫生科,北京%第三军医大学营养卫生学教研室,重庆, 2002, 19(1): 3 - 5.
[7] Du J, Zhu M, Bao H, et al. The Role of Nutrients in Protecting Mitochondrial Function and Neurotransmitter Signaling: Implications for the Treatment of Depression, PTSD, and Suicidal Behaviors[J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2016, 56(15): 2560 - 2578.